



## プラークの酸産生能に対する亜硝酸塩の抑制作用

著者	山本 祐慈
号	40
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第653号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/58133">http://hdl.handle.net/10097/58133</a>

氏 名（本籍）： 山 本 祐 慈

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ）

学 位 記 番 号： 歯 博 第 6 5 3 号

学位授与年月日： 平成 26 年 3 月 26 日

学位授与の要件： 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： プラークの酸産生能に対する亜硝酸塩の抑制作用

論文審査委員：（主査）教授 小 関 健 由

教授 高 橋 信 博

教授 島 内 英 俊

## 論 文 内 容 要 旨

【目的】食物に含まれる硝酸塩は、上部消化管から吸収され、組織内を循環し、一部は耳下腺で濃縮され、唾液として口腔内に分泌される。さらに、その一部は口腔細菌によって亜硝酸塩に還元される。これまでに、亜硝酸塩は*in vitro*でミュータンスレンサ球菌に対し抗菌的に作用することが知られているが、プラーク全体に対する作用については不明である。そこで本研究では、ヒトプラークの酸産生能に対する亜硝酸塩の抑制効果を調べ、また、年齢や齲蝕経験との関連性を検討した。さらに、プラーク自身の硝酸還元活性を測定し、酸産生抑制効果との関連性について検討した。

【方法】一般歯科医院に来院した患者（79名、 $6.1 \pm 2.9$ 歳、 $dft = 2.8 \pm 3.4$ 、 $DMFT = 0.3 \pm 1.0$ ）の口腔内（上顎臼歯頰側）からプラーク（2  $\mu$ L）を採取した。患者は2週間にわたり抗生剤などの投薬を受けていないこと、プラーク採取2時間前から食物を摂取していないことを確認している。プラークは直ちに、36℃のインキュベーター内に設置したコンパクトpHメーターのセンサー部に、20  $\mu$ Lの10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で懸濁された。続いて、10  $\mu$ Lの亜硝酸カリウム（最終濃度0.67 mM）もしくは精製水（コントロール）を添加し、10分間、pH変化を測定し、その後5  $\mu$ Lの5 %グルコース溶液を添加し、さらに10分間、pH変化を測定した。硝酸還元活性は、採取プラークを1.98 mM硝酸カリウム含有10 mMリン酸カリウム緩衝液中に懸濁し、36℃で30分間に産生された亜硝酸塩をGriess反応で比色定量することで求めた。

【結果】亜硝酸塩の添加により、コントロールと比較して、グルコース添加前10分間で、 $0.27 \pm 0.35$  pHユニットのpH低下抑制がみられた（ $p < 0.005$ ）。グルコース添加後では、 $0.23 \pm 0.41$  pHユニットのpH低下抑制がみられた（ $p < 0.005$ ）。この抑制効果は年齢および齲蝕経験と相関はなかったが、グルコース添加によるpH低下活性の大きいプラークほど抑制程度が大きかった（ $p < 0.005$ ）。プラークの硝酸還元活性は $0.32 \pm 0.31$ （ $\Delta A_{550}$ /プラーク懸濁液900  $\mu$ L/30分間）であったが、年齢、齲蝕経験、

プラークpH低下抑制作用との相関はなかった。

【結論】亜硝酸塩はプラークの酸産生能を抑制すること、プラークは硝酸還元活性を持ちその活性には個人差があることが明らかにされた。この抑制効果は、年齢、齲蝕経験および硝酸還元活性と関連しないことがわかった。酸産生能の高いプラークほど効率的に抑制されたことから、亜硝酸塩は、プラークpHの過剰な酸性化を抑制することで、プラークpHの恒常性維持に関与している可能性が示唆される。

## 審 査 結 果 要 旨

口腔内は消化管の入り口であり、多くの解剖学的特徴と口腔細菌叢と呼ばれる常在細菌が多数存在する。中でも歯垢は、その構成成分の7割が細菌菌体、残りが菌体外多糖にて構成され、二大口腔内疾患である齲蝕と歯周疾患の直接的な病原因子となる。よって、歯垢の解析は、構成する個々の細菌の特徴を詳細に解析するミクロからのアプローチと、歯垢の生物活性を全体的に把握して生理的・病理的な意義を検索するマクロからのアプローチの2つがある。これまでの研究は、主に前者の研究手法が主に実施されてきたが、近年のバイオインフォマテックスの飛躍的進歩により、遺伝子レベルのゲノミクス解析、トランスクリプトーム解析、さらにはタンパク質レベルのプロテオソーム解析が行われるようになり、それらの情報に基づいて、生体の代謝そのものを網羅的に把握するメタボローム解析も可能になってきた。そこで、新たに問われるのが、実際の生体の中での生理的・病理的重要性を示すキー分子の抽出である。

本論文は、歯垢中の細菌叢の代謝活性を提示する様々な分子の中でも、これまで余り注目されていなかった硝酸の代謝産物に注目し、歯垢内での硝酸還元経路の中間物質である亜硝酸の作用を検討した。低栄養環境下の環境微生物の相互作用の研究では、硝酸の代謝経路は重要な生物学的指標であり、様々な研究が展開されているが、高栄養環境下にあると考えられてきた口腔内微生物ではあまり重要視されていなかった。しかしながら近年の歯垢内細菌相互作用の研究から、歯垢は高度に細菌間相互作用を発揮している緻密なバイオフィームを形成していることが明らかとなり、バイオフィーム中では細菌の代謝産物等の栄養物質が枯渇した状態である事が示された。即ち、歯垢内では希少な栄養素を巡った細菌間の競合や生き残り戦略等の様々な相互作用が成り立ち、亜硝酸も非常に重要な活性物質なることが十分に考えられる。とくに本研究では、亜硝酸を栄養素としての代謝物質としてだけではなく、歯垢の糖代謝過程への阻害作用を見だし、糖代謝の最終産物である酸の産生を抑制することと、その活性は個人差があることを見だして、歯垢内の生理的・病理的重要性を示すキー分子である可能性を論じている。

以上の成果は、これまであまり注目されていなかった口腔内細菌の亜硝酸代謝に関する新たな知見を付与するものであり、今後の口腔内細菌の代謝経路の解析に新たな項目を設定する道を切り開くものであり、今後のメタボローム解析等の結果を理解し、細菌間の酸産生抑制の相互作用を見だして、口腔内疾患の発症を細菌叢内部からの疾病予防を実現する可能性を示すものである。よって、これらの成果が今後の歯科学研究に大きく貢献すると考えられることから、本論文が博士（歯学）の学位に相応しいと判定する。